



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Cereus repandus EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA *in vitro***

SABRINA MASSERON SELL

Foz do Iguaçu
2021

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Cereus repandus* EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA *in vitro*

SABRINA MASSERON SELL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Foz do Iguaçu
2021

SABRINA MASSERON SELL

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Cereus repandus* EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

Prof. Dra. Leticia Priscilla Arantes
UNILA

Foz do Iguaçu, 11 de junho de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Sabrina Masseron Sell _____

Curso: Biotecnologia _____

	Tipo de Documento
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(x) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Avaliação de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Cereus repandus* em linhagem celular de glioblastoma *in vitro*

Nome do orientador(a): Dr. Jorge Luis Maria Ruiz _____

Data da Defesa: 11/06/2021

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 11 de junho de 2021.

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz, pela oportunidade de conhecer uma nova área de atuação e pela constante orientação neste trabalho.

Aos demais professores que estiveram presentes durante minha formação acadêmica e que puderam contribuir de alguma maneira na minha formação profissional. Em especial, ao Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana, que sempre me apoiou durante minha formação acadêmica e me encorajou a buscar o que eu realmente queria.

Ao meu irmão, Matheus, que sempre foi e vai ser o meu ponto de referência e apoio. Agradeço por sempre estar comigo, mesmo morando longe!

Aos meus pais, por terem compreendido minha situação e terem me auxiliado a finalizar com êxito mais essa etapa da minha vida. À Luna, por ser minha companheira de noites em claro e minha alegria ao chegar em casa.

À Nathália Cecchet, Amanda Fischer, Rafaela Favato, Matheus Araújo, Maria Beatriz e Mateus Feroldi por estarem ao meu lado, principalmente, nesta reta final, me oferecendo apoio tanto acadêmico quanto pessoal. A todos os meus demais amigos que estão comigo desde o início da faculdade.

Aos meus colegas de pesquisa, em especial, ao Anderson, por terem me auxiliado cientificamente ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos muitos dos meus colegas de trabalho, do Laboratório de Biologia Molecular, do Hospital Municipal Padre Germano Lauck, que me ofereceram apoio e estiveram presentes durante esse tempo.

Por fim, à Universidade Federal da Integração Latino Americana (UNILA), por ter me oferecido a oportunidade de estudar em uma instituição de qualidade e que, apesar de todas as dificuldades, fez disso a melhor experiência da minha vida!

Espero ver todos juntos novamente em um momento pós-pandemia!

SELL, Sabrina Masseron. **AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Cereus repandus* EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA *in vitro***. 2021. 61 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

Os gliomas são tumores originados do Sistema Nervoso Central (SNC), que comumente levam a morte dos pacientes pouco tempo após o diagnóstico, apresentando assim uma baixa taxa de sobrevida. Apenas em 2020, foram registrados mais de 300.000 novos casos e 250.000 registros de mortes decorrentes desses tumores, no mundo. Os glioblastomas (GBMs), mais especificamente, são considerados o tipo tumoral mais agressivo desse grupo. O tratamento dos GBMs e dos demais gliomas costuma ser delicado, já que afeta um dos tecidos mais importantes e frágeis do corpo humano. O tratamento costuma ser ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia. A ressecção, quando atrelada aos demais tratamentos, é capaz de aumentar a perspectiva de sobrevida dos pacientes. Apesar de possibilitar esse aumento, o aparecimento de resistência quimioterápica e da reincidência da massa tumoral geralmente são vistas após alguns meses de tratamento. Diante desses expostos, a busca por novos tratamentos mais seletivos, de maior eficácia e que ofereçam menos efeitos colaterais é urgente. A prospecção de novas substâncias naturais que atuam como adjuvantes terapêuticos em terapias oncogênicas tem sido amplamente requerida na tentativa de buscar novos potenciais fármacos antineoplásicos. Nesse sentido, foi avaliado o potencial citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Cereus repandus*, planta da família Cactaceae, na linhagem celular de glioblastoma (U-87), um tipo de glioma de grau IV. Foram preparadas diferentes concentrações do extrato, em 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% e 0,39% (v/v), e sua ação verificada através do ensaio colorimétrico MTT e do ensaio de marcação por DAPI e faloidina. No estudo *in vitro*, o extrato hidroalcoólico não apresentou atividade citotóxica ou mesmo modificações nucleares e de citoesqueleto das células. O valor de IC₅₀ não foi estabelecido, já que o extrato apresentou capacidade citotóxica nula. Além disso, detectou-se através dos ensaios de fluorescência a presença de micoplasmas, os quais podem ter interferido no desenvolvimento dos testes. Para futuros estudos, sugere-se caracterização de moléculas presentes no extrato e a utilização de outras técnicas de extração e/ou outras partes da planta para verificação de seu potencial citotóxico na linhagem celular U-87.

Palavras-chave: câncer, *Cereus repandus*, ensaio colorimétrico, ensaio de fluorescência, glioblastoma, micoplasmas, U-87.

SELL, Sabrina Masseron. **EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF *Cereus repandus* HYDROALCOHOLIC EXTRACT IN GLIOBLASTOMA CELL LINE *in vitro***. 2021. 61 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

ABSTRACT

Gliomas are tumors originating from the Central Nervous System (CNS), which commonly lead to the death of patients shortly after diagnosis, thus presenting a low survival rate. In 2020, more than 300,000 new cases and 250,000 records of deaths caused by these tumors were recorded worldwide. Glioblastomas (GBMs), more specifically, are considered the most aggressive tumor type in this group. The treatment of GBMs and other gliomas is usually delicate, as it affects one of the most important and fragile tissues in human body. The treatment is usually surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy. Resection, when linked to other treatments, is able to increase the patients' survival rates. Despite allowing this increase, the appearance of chemotherapy resistance and the recurrence of the tumor are usually seen after a few months of treatment. In view of those issues, it is urgent to search for new treatments, more selective and effective and that offer fewer side effects. The prospect of new natural substances that can act as therapeutic adjuvants in oncogenic therapies has been widely required in an attempt to search for new potential antineoplastic drugs. In this sense, the cytotoxic potential of the crude hydroalcoholic extract of *Cereus repandus*, plant of the Cactaceae family, over glioblastoma cell line (U-87), a type of grade IV glioma, was evaluated. Different concentrations of the extract were prepared, in 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78% and 0.39% (v/v), and their action verified through the MTT colorimetric assay and the DAPI and phalloidin assay. In the *in vitro* study, the hydroalcoholic extract did not show significant cell inhibition activity or even nuclear and cytoskeletal changes in tested cells. The IC₅₀ value was not established, since the extract showed none cytotoxic capacity. In addition, the presence of mycoplasmas was detected through fluorescence tests, which may have interfered with the development of the tests. For future studies, it is suggested the characterization of molecules present in the extract and the use of other extraction techniques and/or other parts of the plant to verify its cytotoxic potential in the U-87 cell line.

Key words: cancer, *Cereus repandus*, colorimetric assay, fluorescence assay, glioblastoma, mycoplasmas, U-87.

SELL, Sabrina Masseron. **EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Cereus repandus* EN LA LÍNEA CELULAR DE GLIOBLASTOMA**. 2021. 61 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMEN

Los gliomas son tumores que se originan en el Sistema Nervioso Central (SNC), que comúnmente conducen a la muerte de los pacientes poco después del diagnóstico, presentando así una baja tasa de supervivencia. Solo en 2020, se registraron más de 300.000 nuevos casos y 250.000 registros de muertes por estos tumores en todo el mundo. Los glioblastomas (GBMs), más específicamente, se consideran el tipo de tumor más agresivo en este grupo. El tratamiento de los GBMs y otros gliomas suele ser delicado, ya que afecta a uno de los tejidos más importantes y frágiles del cuerpo humano. El tratamiento suele ser la resección quirúrgica, seguida de radioterapia y quimioterapia. La resección, cuando se vincula a otros tratamientos, puede aumentar la perspectiva de supervivencia de los pacientes. A pesar de permitir este aumento, la aparición de resistencias a la quimioterapia y la recidiva de la masa tumoral suelen observarse a los pocos meses de tratamiento. Ante estos argumentos, urge la búsqueda de nuevos tratamientos más selectivos, más efectivos y que ofrezcan menos efectos secundarios. La perspectiva de nuevas sustancias naturales que actúen como adyuvantes terapéuticos en terapias oncogénicas ha sido ampliamente requerida en un intento de buscar nuevos fármacos antineoplásicos potenciales. En este sentido, se evaluó el potencial citotóxico del extracto hidroalcohólico crudo de *Cereus repandus*, planta de la familia Cactaceae, en la línea celular de glioblastoma (U-87), un tipo de glioma grado IV. Se prepararon diferentes concentraciones del extracto, en 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% (v/v), y su acción se verificó mediante el ensayo colorimétrico MTT y el ensayo de DAPI y faloidina. En el estudio *in vitro*, el extracto hidroalcohólico no mostró una actividad inhibidora celular significativa o incluso cambios nucleares y citoesqueléticos en las células. No se estableció el valor de IC₅₀ ya que el extracto mostró una capacidad citotóxica nula. Además, se detectó la presencia de micoplasmas mediante pruebas de fluorescencia, lo que pudo haber interferido con el desarrollo de las pruebas. Para futuros estudios se sugiere la caracterización de moléculas presentes en el extracto y el uso de otras técnicas de extracción y/o de otras partes de la planta para verificar su potencial citotóxico en la línea celular U-87.

Palabras clave: cáncer, *Cereus repandus*, ensayo colorimétrico, ensayo de fluorescencia, glioblastoma, micoplasmas, U-87.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Origem e frequências de alterações genéticas de glioblastomas primários e secundários.....	20
Figura 2. <i>Cereus repandus</i>	28
Figura 3. Layout da placa de 96 poços para a realização do ensaio de MTT.....	33
Figura 4. Processo de obtenção do extrato bruto de <i>C. repandus</i>	35
Figura 5. Morfologia das células U-87 cultivadas sob condições normais sem tratamento.....	36
Figura 6. Placa de 96 poços após aplicação de MTT.....	37
Figura 7. Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Cereus repandus</i> , em diferentes concentrações, sobre a viabilidade das células U-87.	38
Figura 8. Influência do extrato, na concentração de 3,125%, sobre o núcleo e citoesqueleto de células U-87, avaliada por microscopia de fluorescência.....	40
Figura 9. Influência do extrato, na concentração de 6,25%, sobre o núcleo e citoesqueleto de células U-87, avaliada por microscopia de fluorescência.....	41
Figura 10. Morfologia do núcleo e citoesqueleto de células U-87, sem tratamento, avaliada por microscopia de fluorescência.	42
Figura 11. Análise da presença de micoplasmas no cultivo de células U-87.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reguladores presentes em neoplasias, processos apoptóticos e resistência a medicamentos.....	17
Tabela 2. Taxa de sobrevida de pacientes com diferentes tipos de tumores cerebrais.	19
Tabela 3. Propriedades biológicas de algumas espécies da família Cactaceae.	27
Tabela 4. Valores médios de viabilidade celular da linhagem de glioblastoma humano U-87 após exposição de diferentes concentrações do composto-teste.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
BCNU	Carmustina
CCNU	Lomustina
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DGLA	Ácido dihomogama-linolênico
DHA	Ácido docosa-hexaenoico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GBM	Glioblastoma Multiforme
GLA	Ácido gama-linolênico
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
LOH	Loss of heterozygosity
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
MTT	Ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TMZ	Temozolamida
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER	15
2.2 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
2.3 ANTITUMORAIS	21
2.3.1 Tratamento antitumoral para glioblastomas	23
2.4 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS DERIVADOS DE PLANTAS	24
2.4.1 Família Cactaceae	25
2.4.2 <i>Cereus repandus</i>	28
3 OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVOS GERAIS	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>C. repandus</i>	31
4.2 CULTURA DE CÉLULAS	31
4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	32
4.4 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E INTEGRIDADE DO DNA	33
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5 RESULTADOS	35
5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>C. repandus</i>	35
5.2 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT	35
5.3 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E INTEGRIDADE DO DNA	38
5.4 DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM CULTIVO CELULAR	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Dos inúmeros desafios enfrentados na medicina, a corrida pelo tratamento e cura do câncer é um dos mais difíceis (CHABNER; JR, 2005). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês: *International Agency for Research on Cancer*, IARC) estima que, só em 2020, em escala mundial, a incidência dos principais tipos de cânceres chegou a quase 20 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes pela doença (IARC, 2020). Além disso, dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) revelam que mais de 2% desses novos casos são de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC). Apesar da baixa frequência de casos, esse câncer contribui significativamente para a alta taxa global de mortalidade (INCA, 2020b).

Dentre os inúmeros tipos de cânceres, os tumores do SNC, em especial, destacam-se por sua elevada malignidade e baixa taxa de sobrevida. A taxa de incidência mundial desse grupo tumoral, apenas no ano de 2020, foi de 10,74 a cada 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2020). Além disso, as propriedades invasivas dos tumores do SNC contribuem para um mau prognóstico e os tornam de grande relevância na clínica médica (RAO, 2003).

Com o grande aumento da ocorrência e da mortalidade provocadas pelos cânceres, pesquisadores então têm ido em busca de fármacos mais eficazes para o tratamento e cura dessas doenças. De acordo com a *The Pharmaceutical Research and Manufactures of America* (PhRMA), só em 2020, mais de 1.300 medicamentos e vacinas têm sido desenvolvidos através de inovações biotecnológicas, para os mais diferentes tipos de cânceres (PhRMA, 2020; SOLOWEY *et al.*, 2014).

Apesar do avanço no desenvolvimento de fármacos, ainda são encontrados inúmeros efeitos adversos na sua utilização usual no tratamento antitumoral. Dessa forma, a busca por novas substâncias terapêuticas com maior atividade citotóxica contra tumores atrelada a menor toxicidade em relação a células normais vem sendo o foco de muitos pesquisadores da área de desenvolvimento de quimioterápicos (MANN, 2002; RIBEIRO, 2012).

Produtos de origem natural têm demonstrado grande importância como fontes de compostos antineoplásicos. Newman e Cragg (2012) apontam que cerca de 75% dos medicamentos antitumorais e quase 70% dos agentes anti-

microbianos que são utilizados, atualmente, na indústria, provêm de produtos naturais. Dentre eles, destacam-se os produtos derivados de plantas (NEWMAN; CRAGG, 2012). Essas descobertas tornaram possível o desenvolvimento de medicamentos como a vimblastina, vincristina e o topotecan, que estão entre os quimioterápicos mais eficazes atualmente disponíveis (CRAGG, 2014).

Mais especificamente, as plantas da família Cactaceae, grupo que apresenta mais de 1500 espécies e que são amplamente distribuídas, principalmente, na região nordeste do Brasil (BRAVO FILHO *et al.*, 2018; HARLEV *et al.*, 2013), apresentam alguns estudos quanto aos seus potenciais farmacológicos (AGRA *et al.*, 2008; HARLEV *et al.*, 2013). Dessa forma, essa família se torna de grande interesse de pesquisadores na busca de novos fármacos (HARLEV *et al.*, 2013).

Sabendo-se dos possíveis potenciais farmacológicos de plantas nativas utilizadas pela população e da grande problemática relacionada ao tumor cerebral, faz-se necessária a realização de testes para verificação da citotoxicidade proveniente de possíveis moléculas bioativas dessas plantas sobre linhagens celulares neoplásicas. Dessa forma, objetivou-se, por meio deste trabalho, avaliar o potencial do extrato hidroalcoólico de *Cereus repandus*, planta da família Cactaceae, em reduzir a proliferação celular da linhagem de glioblastoma, U-87, *in vitro*, através de ensaios de citotoxicidade e alterações celulares. Os resultados obtidos poderão auxiliar em trabalhos futuros no desenvolvimento de um possível fármaco adjuvante na terapia de diferentes malignidades que envolvem os tumores do SNC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

O processo de proliferação celular pode ser controlado ou não (PECORINO, 2012). Quando o ciclo de desenvolvimento celular ocorre de maneira regulada, tem-se um aumento autolimitado do número de células, que, de maneira geral, é estimulado por fatores fisiológicos e químicos. Já quando ocorre uma proliferação não controlada, há um aumento da massa tecidual do organismo de forma excessiva, com falhas no processo apoptótico natural e perturbação da arquitetura tecidual normal (PECORINO, 2012). Nesse caso, esse fenômeno é conhecido como neoplasia, podendo, na prática, ser denominado de câncer, quando em sua forma maligna (INCA, 2020a).

A neoplasia é considerada qualquer aumento desproporcional do número de um determinado grupo celular. Esse fenômeno é gerado a partir de mutações no material genético, através de uma modificação direta de um segmento de DNA ou mesmo a partir de mutações em genes reguladores do ciclo celular, como os proto-oncogenes ou genes supressores tumorais (PIEROTTI et al., 2017). Essas alterações podem então resultar em neoplasias benignas ou malignas. A primeira resulta de um crescimento celular lento, expansivo, geralmente, limitado por uma cápsula e sem invasão de tecidos adjacentes, não sendo capazes de provocar metástases. Nesse caso, alterações nucleares são mínimas, com hipercromasias, pleomorfismos e altos níveis de mitoses praticamente ausentes. Por outro lado, uma neoplasia maligna tende a apresentar células com um crescimento rápido, hipercromasia nuclear, nucléolos proeminentes e frequentemente metastizadas (JANG; GARDNER; RO, 2011).

A ocorrência de metástase, no processo de formação tumoral, é dependente de fatores intrínsecos das próprias células (VALASTYAN, 2012). De acordo com Pecorino (2012), na fase inicial de desenvolvimento do tumor primário, as células precisam de altos teores de nutrientes e oxigênio, que são fornecidos através da angiogênese (PECORINO, 2012). Nesse processo, os vasos sanguíneos carregam inúmeras substâncias, como o fator de crescimento de células endoteliais vasculares, (do inglês: “*vascular endothelial growth factor*”, VEGF) que se ligam a receptores específicos (CAO, 2015). A partir disso, há a proliferação de células endoteliais e o remodelamento da matriz extracelular

(MEC) e essas alterações, que incluem expressão de enzimas específicas, atuam sobre a membrana basal (MB), que é a primeira estrutura que sofre degradação no processo de invasão das células neoplásicas. O rompimento dessa membrana auxilia a migração das células tumorais para o sistema circulatório e permite a disseminação à distância (PECORINO, 2012; VALASTYAN, 2012).

Além disso, as células naturalmente apresentam mecanismos intrínsecos que levam a apoptose para o alcance da homeostase. No caso de células tumorais e metastáticas, tais mecanismos acabam sendo suprimidos, em uma via de regulação contrária do ciclo celular. A interrupção da via apoptótica acaba sendo, portanto, extremamente comum nesses tipos celulares (ALBERTS *et al.*, 2017). Esse processo pode ocorrer através de alterações nos proto-oncogenes ou nos genes supressores tumorais, tais como o gene da p53, que quando perdem sua função acarretam o acúmulo de mutações e propiciam o desenvolvimento tumoral. Não somente isso, mas muitos efetores a jusante (PTEN, Bax, Bak e Apaf-1) ou a montante (ATM, Chk2, Mdm2 e p19^{ARF}) a esse gene podem sofrer mutações funcionais (Tabela 1) (JOHNSTONE *et al.*, 2002). Isso indica, portanto, que a presença da p53 não significa necessariamente que a via esteja intacta, mas deve-se considerar também a presença de anormalidades em outras vias adjacentes a via da p53. Apesar disso, verifica-se usualmente a presença de mutações em genes supressores tumorais em grande parte das células cancerígenas (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

Tabela 1. Reguladores presentes em neoplasias, processos apoptóticos e resistência a medicamentos.

Proteína	Papel em neoplasias, apoptose e resistência a drogas
p53	Mutação em muitos tipos de câncer. Inicia a via apoptótica intrínseca. As células p53 são resistentes à apoptose induzida por drogas.
p19^{ARF}	Mutação em muitos tipos de câncer. Aumenta a apoptose induzida por drogas por p53.
ATM	Mutado na síndrome de Ataxia Telangiectasia. Detecta a quebra da fita dupla do DNA e estabiliza a p53. As deficiências aumentam o risco de desenvolver neoplasias hematológicas e câncer de mama.
Chk2	Mutado na síndrome de Li-Fraumeni. Detecta quebras de fita dupla de DNA, fosforila e estabiliza a p53.
Bax	Mutação em alguns tumores. Medeia o dano à membrana mitocondrial. Apoptose induzida por drogas.
Bak	Expressão diminuída em alguns tumores. Medeia o dano à membrana mitocondrial. Apoptose induzida por drogas.
Apaf-1	Mutado e silenciado em linhas de células de melanoma e leucemia. As células Apaf-1 são quimiorresistentes.
Mdm2	Superexpressão em alguns tumores. Regulador negativo de p53. Inibe a ativação de p53 induzida por drogas.
PTEN	Mutação em cânceres. A perda de PTEN resulta em resistência a muitos estímulos apoptóticos.
Bcl-2	Superexpressão em muitos tumores. Antagoniza a ação de Bax e/ou Bak, assim, inibindo a ruptura da membrana mitocondrial. Inibe a apoptose induzida por drogas.

Fonte: adaptado de Johnstone *et al.* (2002).

É importante citar também que essas mutações são amplamente encontradas em neoplasias esporádicas, como cânceres de mama, ovário, do colo do útero, esôfago, pele, carcinomas de pulmão, glioblastomas e carcinomas hepatocelulares. Além disso, mais especificamente, em alterações genéticas provenientes da p53, há uma maior predisposição a cânceres do tipo familiar. Dessa forma, é imprescindível o conhecimento de fatores genéticos intrínsecos das células neoplásicas para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (NUSSBAUM, 2016; SCHON, 2018).

2.2 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O tumor cerebral primário se origina do SNC, que compreende uma gama de tipos tumorais que podem ser benignos ou malignos. A literatura aponta que pacientes acometidos com esse tipo de câncer costumam permanecer assintomáticos até a manifestação clínica da doença, o que nesse momento indica um estágio mais avançado do tumor (LOUIS *et al.*, 2016). Dentre os sintomas clínicos destacam-se fortes dores de cabeça, mudanças de personalidade, convulsões, náuseas, perda sensorial, disfunção do campo visual, entre outros (LOUIS *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu uma classificação para os diversos tipos de tumores do SNC, utilizando-se de aspectos moleculares e histológicos. Por serem um grupo bastante heterogêneo, esses tumores podem ser divididos, de acordo com suas características e em diferentes graus clínicos, sendo os principais tumores do tipo astrocitomas, oligodendrogliomas, ependiomas e glioblastomas (LOUIS *et al.*, 2016).

Quando provenientes das células da glia, os tumores cerebrais são denominados gliomas e comumente levam a morte dos pacientes pouco tempo após o diagnóstico, apresentando assim uma baixa taxa de sobrevivência. De acordo com a IARC, apenas em 2020, foram registrados mais de 300.000 novos casos e 250.000 registros de mortes decorrentes desse grupo, no mundo. Além disso, os gliomas são responsáveis por quase 30% dos tumores cerebrais primários e 80% de todos os tumores malignos existentes. (GLOBOCAN, 2020; WELLER *et al.*, 2015).

Os gliomas podem ainda ser divididos em quatro grupos, conforme grau de malignidade, sendo esses de grau I, que acometem principalmente crianças

e jovens; de grau II, também denominados gliomas difusos de baixo-grau, que podem progredir para um glioma de alto grau; de grau III, ou também conhecidos como gliomas anaplásicos, que acometem indivíduos na faixa dos 49 anos e incluem os oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e astrocitomas anaplásicos; e, por último, glioma de grau IV, ou também conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), sendo o mais comum e agressivo dos gliomas (ALENTORN *et al.*, 2015).

Mais especificamente, os glioblastomas multiformes, classificados como grau IV de malignidade tumoral, correspondem a quase 60% de todos os tumores gliais existentes no mundo. Além disso, podem ainda ser agrupados em primário e secundário, sendo o primeiro, de maior ocorrência em pessoas mais velhas, e o segundo, de principal ocorrência em pacientes jovens, que se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico (LOUIS *et al.*, 2016; OHGAKI; KLEIHUES, 2007; WELLER *et al.*, 2015).

As taxas de sobrevida apresentadas na tabela 2 comparam os pacientes com determinado tipo e o estágio do tumor cerebral. Essas taxas são baseadas em resultados de indivíduos que tiveram a doença, em um período de cinco anos:

Tabela 2. Taxa de sobrevida de pacientes com diferentes tipos de tumores cerebrais.

Tipo de tumor	Grau	Taxa de sobrevida de 5 anos		
		Idade		
		20 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos
Astrocitoma de baixo grau	II	73%	46%	23%
Astrocitoma anaplásico	III	58%	29%	15%
Glioblastoma	IV	22%	9%	6%
Oligodendroglioma	II	90%	82%	69%
Oligodendroglioma anaplásico	III	76%	67%	45%

Ependimoma e ependimoma anaplásico	II e III	92%	90%	87%
Meningioma	I, II e III	84%	79%	74%

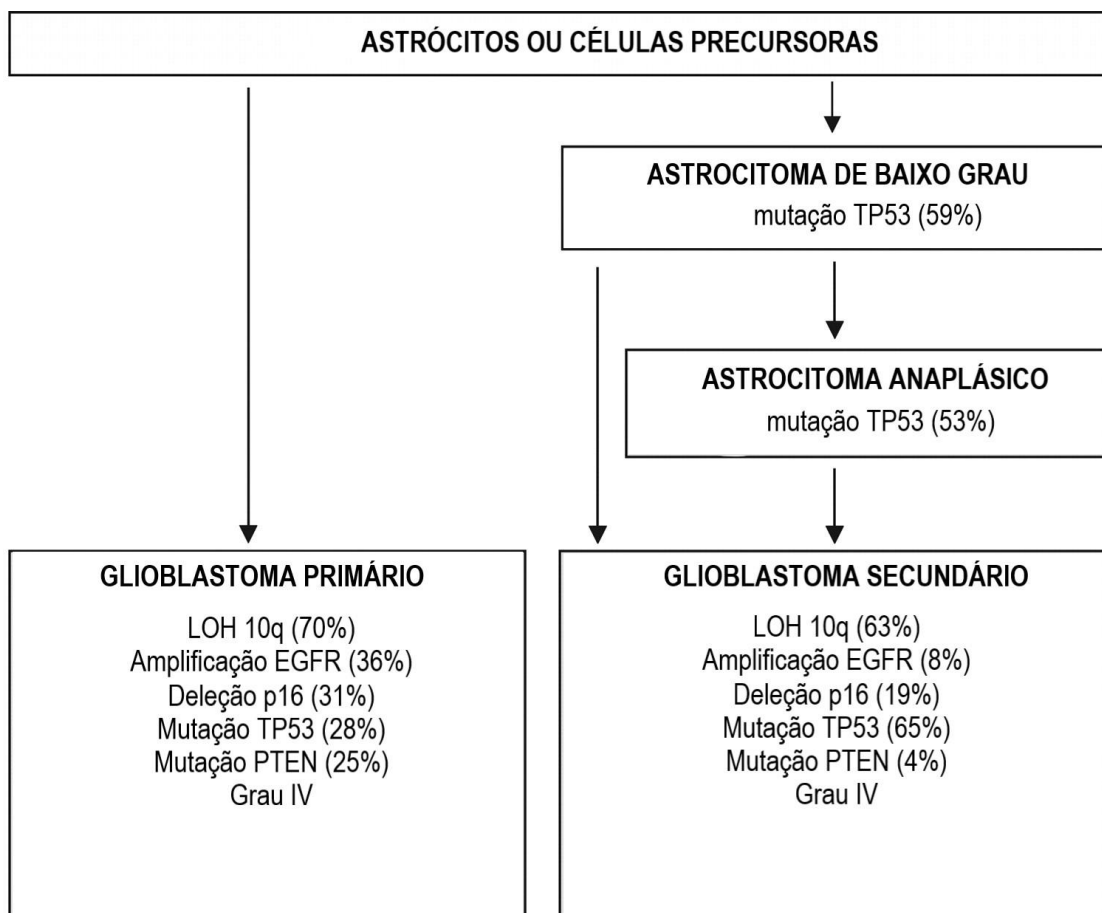
Fonte: (LEFRANC *et al.*, 2006; SOCIETY, 2020).

A origem de um glioma pode ser dada tanto por uma célula cerebral normal que se desdiferencia, quanto por uma célula progenitora que sofre transformações genéticas. Mais especificamente, em um glioblastoma, mutações na via TP53 têm papel fundamental no seu desenvolvimento. Essas mutações são uma das primeiras alterações detectáveis nas células neuronais, podendo aparecer tanto em casos de glioblastomas primários e secundários. De acordo com a literatura, apesar de distintos, os dois grupos apresentam algumas características em comum, como invasão do tecido adjacente, resistência a agentes terapêuticos e alterações genéticas em genes de supressão tumoral, como o p16 e RB1, além de perda de PTEN e alterações no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (MCLENDON *et al.*, 2008; OHGAKI *et al.*, 2004; OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

Convém citar também que alterações genéticas provenientes da perda de heterozigose (LOH) no cromossomo 10 (LOH 10q) são frequentemente vistas na maioria dos casos de GBMs, tanto primários, quanto secundários. Estudos já analisaram a deleção de loci específicos, tais como o 10q23-24 (PTEN), o que sugere a presença de genes supressores de tumor presentes na patogênese dos glioblastomas. Além disso, é visto que a LOH 10q somada a outras alterações genéticas pode contribuir ainda mais para o desenvolvimento de GBM. De acordo com Ohgaki *et al.* (2007), na via de formação do glioblastoma secundário, as alterações no gene TP53 ocorrem logo no início, enquanto que na LOH 10q essas alterações são mais tardias (Figura 1) (OHGAKI *et al.*, 2004; OHGAKI; KLEIHUES, 2007). Por último, visualiza-se frequentemente alterações no gene EGFR, que são altamente expressos na maioria dos tumores, e relacionam-se, principalmente, à proliferação, invasão e resistência terapêutica à apoptose (MELLINGHOFF *et al.*, 2005).

Figura 1. Origem e frequências de alterações genéticas de glioblastomas

primários e secundários.



Fonte: Adaptado de Ohgaki (2004).

2.3 ANTITUMORAIS

Uma das principais alternativas para o tratamento do câncer é a quimioterapia. Esse tipo de intervenção faz o uso de quimioterápicos, que deveriam atuar diretamente nas células tumorais, através de efeitos citotóxicos, sem agir de forma maléfica sobre as células saudáveis. Apesar disso, comumente, vê-se que muitos desses agentes apresentam falhas em sua eficácia, tanto por falta de especificidade, o que leva a morte de células normais e leva ao aparecimento de toxicidade sistêmica, quanto ao surgimento de resistência aos agentes citotóxicos pelas células tumorais (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

Os efeitos colaterais, no geral, são um dos principais agravantes da utilização de agentes quimioterápicos em pacientes com câncer. A falta de especificidade, que leva a toxicidade sistêmica, acaba afetando principalmente células hematopoiéticas e células intestinais normais, além da matriz de

queratinócitos dos cabelos. Estes efeitos são atrelados principalmente ao fenômeno de apoptose induzida por genes, tais quais o da p53 (JOHNSTONE *et al.*, 2002; KOMAROVA; GUDKOV, 2000).

Como citado, a p53 é uma proteína ligada a supressão tumoral. De acordo com Komarova *et al.* (2000), a ativação da apoptose p53-dependente auxilia na eliminação de possíveis fatores cancerígenos das células. No entanto, a atividade dessa proteína também pode ser perigosa para o organismo. Dessa forma, é visto que para reduzir muitos dos efeitos colaterais gerados durante o processo de quimioterapia é necessário inibir a atividade da p53. Apesar disso, a interrupção da atividade apoptótica proveniente da proteína pode também ser controversa, já que pode acelerar o desenvolvimento do tumor (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

Além disso, a resistência do câncer em relação aos agentes antitumorais também é um grande problema encontrado ao longo da terapia. Esse processo pode ser dado tanto de forma intrínseca quanto adquirida. Na primeira forma, há a presença de fatores de resistência pré-existentes, o que podem acabar levando a ineficácia da terapia. Já na segunda, a resistência desenvolve-se durante o tratamento tumoral em células que inicialmente eram sensíveis, mas que sofreram algum tipo de mutação, bem como outras respostas adaptativas (HOLOHAN *et al.*, 2013).

De acordo ainda com Holohan *et al.* (2013), os tumores, por serem um conjunto de células com uma alta heterogeneidade molecular, tendem a apresentar mecanismos de resistência devido a uma pressão seletiva induzida pelo tratamento antitumoral. Essa seleção seria dada pela existência de uma subpopulação celular naturalmente resistente que estaria presente no tumor original. Dessa forma, o tratamento quimioterápico apresentaria uma eficácia inicial, mas com uma futura reincidência do tumor (HOLOHAN *et al.*, 2013).

Convém citar também outra problemática em torno da terapia antitumoral, em que muitos tratamentos contra o câncer se encontram indisponíveis ou estão disponíveis em poucas opções. Para o tratamento de GBMs, por exemplo, poucos avanços terapêuticos foram obtidos. Isso é dado principalmente pela ineficácia terapêutica que geralmente é apresentada nos testes iniciais, além da incapacidade da droga de atravessar a barreira hematoencefálica. Apesar disso, os poucos fármacos disponíveis, como a Carmustina (BCNU), a Lomustina

(CCNU) e a Temozolamida (TMZ), já demonstraram alguns resultados positivos e têm sido utilizados na rotina desse tratamento tumoral (SILVA, 2016).

2.3.1 Tratamento antitumoral para glioblastomas

O mau prognóstico que existe no grupo dos tumores cerebrais, faz com que os pacientes acometidos com tais cânceres apresentem uma taxa de sobrevida baixa. A partir do momento do diagnóstico, o tempo médio de sobrevivência varia de 17 a 30 semanas, através de cirurgias e radioterapias. Apesar do leve aumento no tempo de vida obtido através do uso de quimioterápicos, de aproximadamente 50 semanas, os tratamentos tradicionais acabam não sendo efetivos para a cura devido ao grande potencial invasivo dos tumores (SATHORNSUMETEE; RICH, 2006). Além disso, a idade costuma ser um fator determinante para os níveis altos de morbidade e mortalidade, já que, geralmente, pacientes mais velhos acabam apresentando piora (RAO, 2003).

O tratamento dos GBMs e dos demais gliomas, geralmente, consiste em uma abordagem mais branda, já que afeta um dos tecidos mais importantes e frágeis do corpo humano. A opção padrão para o tratamento costuma ser ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e/ou quimioterapia. A ressecção por si só auxilia no aumento de sobrevida de seis meses, mas quando atrelada aos demais tratamentos, é capaz de aumentar por mais alguns meses (WILSON; KARAJANNIS; HARTER, 2014). Apesar disso, a estratégia de remoção cirúrgica dos tumores costuma ser arriscada, visto que, esses costumam ter características invasivas e sua remoção completa se torna inviável, dependendo da extensão da área afetada e da região em que a massa tumoral se encontra (SILVA, 2016).

Dessa forma, é visto que, estratégias adjuvantes na terapia antitumoral costumam garantir uma melhor eficácia e segurança ao paciente. Nesse caso, a utilização de um tratamento farmacológico e/ou radiológico é importante, já que auxilia na remoção de células que ainda permaneceram na região tumoral, após, por exemplo, uma intervenção cirúrgica (SILVA, 2016).

A radioterapia, por exemplo, é um tratamento adjuvante muito conhecido para glioblastomas e é utilizado, principalmente, nos casos em que não há possibilidade de intervenção cirúrgica (SILVA, 2016). Apesar disso, a resposta obtida através desse tipo de tratamento, costuma ser temporária. Isso ocorre

devido ao tempo de remissão e estabilização do tumor ser curto nesses casos, podendo a massa tumoral reaparecer muitas vezes maior que o tumor primário, piorando assim o quadro clínico do paciente afetado (HOCHBERG; PRUITT, 1980). Além disso, o mau prognóstico dessa doença é levado em consideração quando o tratamento radiológico é recomendado, já que doses elevadas costumam apresentar alto risco de complicações (FONSECA; SANTOS; CARVALHO, 2003). Dentre algumas complicações já relatadas no uso de radioterapia para os tumores do SNC estão radionecrose, lesões na medula espinhal, disfunção hipotálamo-hipofisária e déficit intelectual (FONSECA; SANTOS; CARVALHO, 2003).

No que diz respeito ao tratamento farmacológico, a utilização de Temozolomida costuma ser a principal opção (TIEK *et al.*, 2018). O TMZ é, atualmente, o fármaco que apresenta a maior capacidade de melhorar a sobrevida de pacientes com glioblastoma. Esse agente quimioterápico é uma molécula lipofílica, classificado como uma imidazotetrazinona, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e apresenta estabilidade em pH ácido. Sua administração é feita por via oral e, geralmente, é utilizado como adjuvante as outras formas de tratamento (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). Apesar de possibilitar o aumento da sobrevida dos pacientes, o aparecimento de resistência quimioterápica e efeitos colaterais geralmente são vistos após alguns meses de tratamento (TIEK *et al.*, 2018). Diante desses expostos, a busca por novos tratamentos mais seletivos, de maior eficácia e que ofereçam menos riscos ao paciente é urgente.

2.4 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS DERIVADOS DE PLANTAS

Muitas plantas têm sido amplamente utilizadas na área da saúde com a intenção de prover efeitos terapêuticos no tratamento e prevenção de inúmeras doenças, tais como o câncer (SOLOWEY *et al.*, 2014). Além disso, é visto que o aumento dos efeitos colaterais e da resistência, provenientes do uso constante de quimioterápicos usuais, vem despertando um interesse cada vez maior de pesquisadores em buscar agentes antineoplásicos mais eficazes e menos agressivos (HARLEV *et al.*, 2012a). Dessa forma, a utilização de compostos bioativos ou componentes naturais provenientes de plantas sugere uma alternativa promissora para a terapia de câncer.

Embora haja algumas alternativas existentes para o tratamento de glioblastomas, grande parte dos medicamentos são ineficazes. Com isso, pesquisadores tem se interessado na busca de alternativas naturais para auxiliar no tratamento. Alguns estudos têm relatado alguma eficácia na utilização sinérgica de compostos derivados de plantas com esse fármaco, como a vimblastina, vincristina, resveratrol, quercetina, Withaferin A, berberina e alguns compostos flavonoides (VENGOJI *et al.*, 2018).

2.4.1 Família Cactaceae

Plantas da família Cactaceae, em geral, são encontradas em regiões desérticas e semiáridas. No Brasil, grande parte desse grupo se encontra na região Nordeste, onde encontra-se grande biodiversidade de plantas do semiárido (AGRA; DE FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Além disso, verifica-se um interesse cada vez maior entre os pesquisadores no estudo do uso tradicional de plantas dessa região, por apresentarem grande potencial farmacêutico ainda não totalmente descoberto (AGRA *et al.*, 2008).

Devido ao fato de estarem sempre expostas a condições de estresse, como escassez de água e forte incidência solar, essas plantas puderam desenvolver sistemas de defesa úteis para sua sobrevivência. Esses sistemas englobam metabolitos secundários, como flavonoides, terpenos e taninos. A literatura ainda aponta que, por se desenvolverem em regiões com poucos nutrientes e com condições climáticas adversas, essas plantas são muito dependentes dessas defesas químicas que produzem (HARLEV *et al.*, 2012a, 2012b).

De acordo com Wan *et al.* (2007), essas condições de estresse podem ainda levar a uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), que pode ser extremamente tóxica para as plantas. Além disso, é visto que as ROS são bastante encontradas no surgimento de patologias e infecções, como doenças neurodegenerativas e na carcinogênese, em seres humanos. Dessa forma, um modo de defesa gerado pelas plantas, ao longo do tempo, foi o desenvolvimento de sistemas antioxidantes eficazes, que podem ou não incluir a participação de enzimas antioxidantes (FINKEL; HOLBROOK, 2000; WANG *et al.*, 2007).

As propriedades antioxidantes atreladas a baixa toxicidade em células

normais, quando comparadas a produtos químicos sintéticos fazem com que os extratos de cactáceas apresentem um grande potencial farmacológico, além de contribuírem no tratamento antimicrobiano, anti-inflamatório, antitumoral, analgésico e cicatrizante (Tabela 3) (AGOSTINI-COSTA, 2020). Estudos apontam que algumas estruturas modificadas dos cactos, como os cladódios, apresentam compostos bioativos, como terpenos, betalaínas, ácidos graxos e ácido ascórbico, que são amplamente conhecidos por seus potenciais antioxidantes (HARLEV *et al.*, 2013). Além disso, ao longo da literatura, várias espécies de cactos já demonstraram atividades citotóxicas para diversas linhagens tumorais *in vitro*, a partir de compostos triterpênicos e polifenólicos (JAYAKUMAR; KANTHIMATHI, 2011; SALAZAR; MARTINEZ-VAZQUEZ, 2011; ZOU *et al.*, 2005).

Os compostos triterpênicos já demonstraram grande potencial de atividade citotóxica sobre uma série de linhagens celulares tumorais, que incluem desde adenocarcinomas de mama (MCF-7) (JAYAKUMAR; KANTHIMATHI, 2011), carcinoma pancreático (MIA-PaCa-2) e carcinoma de colo de útero (HeLa) (MISHRA *et al.*, 2016).

Tabela 3. Propriedades biológicas de algumas espécies da família Cactaceae.

Propriedades	Espécies	Referências
Atividade inibitória contra agentes patogênicos	<i>Cereus jamacaru</i> <i>Hylocereus polyrhizus</i>	(DAVET et al., 2009) (YONG et al., 2019)
Atividade anti-inflamatória	<i>Pilosocereus gounellei</i>	(DE OLIVEIRA et al., 2018)
Cicatrizantes	<i>Cereus gounellei</i>	(SOUSA et al., 2018)
Potencial controle da obesidade e distúrbios metabólicos relacionados	<i>Cereus jamacaru</i>	(DE MEDEIROS et al., 2019)
Citotoxicidade e atividade antitumoral	<i>Hylocereus monacanthus</i> <i>Myrtillocactus geometrizans</i> <i>Hylocereus monacanthus</i>	(KIM et al., 2011) (BOLAÑOS-CARRILLO et al., 2015) (WU et al., 2006)

2.4.2 *Cereus repandus*

A *Cereus repandus* (L.) Mill. é uma planta pertencente à família Cactaceae, derivada de regiões subtropicais, como Brasil e Argentina. Identificada como sinônimo de *C. peruvianus*, essa planta apresenta subespécies, como *Cereus repandus* var *monstrosus* e *Cereus peruvianus* var. *tortuosus*, que são conhecidas pelo seu uso medicinal (Figura 2) (FARIA-TAVARES *et al.*, 2013; KARIMI *et al.*, 2012).

Popularmente conhecida como “*mandacaru*”, no Brasil, essa cactácea distribui-se principalmente na região Nordeste, pelos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia. Apesar dos baixos teores de vitaminas, a planta também é amplamente utilizada na alimentação humana em períodos de seca, já que a mesma apresenta mecanismos de absorção e retenção de água (TANAKA, 2010).

Figura 2. *Cereus repandus*



Fonte: autoria própria.

Em relação ao seu uso medicinal, Karimi *et al.* (2012) aponta que essas plantas apresentam grande potencial no tratamento de pacientes com câncer de mama e próstata, além de distúrbios neurodegenerativos. Isso é dado principalmente pela presença de ácidos graxos poli-insaturados, compostos alcaloides e acetato, que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica (KARIMI *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mais especificamente, apresentam grande potencial benéfico no tratamento antitumoral, já que auxiliam na redução da resposta inflamatória, do processo de angiogênese, além de inibir a carcinogênese e aumentar a eficácia de quimioterápicos (JACOMINI et al., 2015). Mais especificamente, os ácidos gama-linolênico (GLA), dihomogama-linolênico (DGLA), eicosapentaenoico (EPA) e docosa-hexaenoico (DHA) estão firmemente relacionados a inibição da tumorigênese, se mostrando muitas vezes não tóxicos para células normais (JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998). Com isso, estudos realizados por Jiang *et al.* (1998) procuraram diferentes estratégias para aumentar os níveis de citotoxicidade dos ácidos graxos insaturados em diferentes tipos celulares tumorais. Dessa forma, a *C. repandus* se apresenta como uma possível fonte desses compostos bioativos que atuam no tratamento antitumoral, podendo ser elegível para esse trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial antineoplásico e citotóxico exibido pelo extrato hidroalcoólico de *Cereus repandus* na linhagem celular de glioblastoma.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica do extrato de *C. repandus* em modelo celular para glioblastoma.
- Avaliar modificações nucleares induzidas pelo extrato na linhagem tumoral.
- Avaliar a capacidade do extrato de modificar o citoesqueleto das células neoplásicas.

4 METODOLOGIA

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia aplicado à Saúde da UNILA e no Departamento de Laboratórios de Ensino da UNILA. Uma muda de *C. repandus* foi adquirida de floricultura localizada na cidade de Foz do Iguaçu, estado do Paraná, Brasil, no mês de abril de 2021.

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *C. repandus*

Para a obtenção do extrato bruto hidroalcoólico de *C. repandus* foi utilizada uma adaptação da metodologia de Jafarian *et al.* (2014). Para tanto, 20,4g do cladódio de *C. repandus* foram macerados e misturados a 100 mL de uma solução etanol/água (70/30), em um agitador magnético, durante 3h, a temperatura ambiente. O conteúdo foi filtrado e levado a um evaporador rotativo para evaporação do conteúdo etanólico e aumento da concentração do extrato. A solução final foi armazenada em refrigeração, a -20° C, a fim de garantir a preservação das biomoléculas presentes no extrato (JAFARIAN; GHANNADI; MOHEBI, 2014).

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Foi utilizada para o estudo a linhagem celular de glioblastoma humano, U-87. Para a manutenção e crescimento da linhagem, as células foram crescidas em frascos de cultura de 75 cm², contendo 10 mL de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. Os frascos então foram acondicionados em estufa a 37° C, CO₂ 5% e umidade de 75%.

Para expansão e subcultivo, o meio de cultura foi removido e as células lavadas em solução salina de fosfatos (PBS 1x). Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução de tripsina e as células incubadas de 2-5 minutos, em estufa, a 37° C. Para inativação da enzima, foram adicionados 10 mL de meio completo no frasco. Com o auxílio de pipetas Pasteur estéreis, o conteúdo do frasco foi transferido para tubos Falcon de 15 mL. A partir disso, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 1200 rpm, até a formação de um pellet. Por fim, o sobrenadante foi descartado e a suspensão celular ressuspendida em 10 mL

de meio completo.

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para realizar o teste de citotoxicidade celular, foi realizado o ensaio colorimétrico, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), adaptado de Carmichael *et al.* (1987). Dessa forma, para a avaliação da linhagem U-87, foi, primeiramente, necessário realizar a contagem de células para determinar sua densidade por mililitro de meio. Essa análise foi realizada com corante azul de Tripán, em câmara de Neubauer, e auxilia na diferenciação de células viáveis, as quais não são permeáveis ao corante, de células não-viáveis, que sofrem ação do corante, permanecendo azuis. A estimativa do número total de células foi realizada pela seguinte equação:

$$N^{\circ} \text{ total de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}}$$

A suspensão celular obtida no processo de cultivo foi então cultivada em uma placa de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço, e 50 uL por poço. Em seguida, a placa foi incubada em estufa, a 37° C. Após 24h, foram adicionadas aos poços a solução-teste, nas concentrações calculadas em proporção volume de extrato pelo volume de solução (v/v), sendo de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% e 0,39%, todas em sextuplicatas, e incubadas por mais 12h. Passado o tempo de tratamento, foram adicionados 20 uL da solução MTT, com uma nova incubação por 4h e 37° C, ao abrigo de luz. A partir disso, o meio foi retirado e os cristais de formazan diluídos em 100 uL de DMSO. Dessa forma, os resultados foram lidos em espectrofotômetro em 492 nm e 630 nm (CARMICHAEL *et al.*, 1987).

Para o controle negativo, ou seja, poços sem tratamento, foram utilizados 50 uL por poço de meio completo a linhagem. Já como controle positivo, foi utilizada a solução de DMSO 20%, para obtenção de morte celular (Figura 3).

Figura 3. Layout da placa de 96 poços para a realização do ensaio de MTT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	C-	C+	
	↓	↓									

Nota: Os poços numerados de 1 a 8 indicam as diferentes concentrações testadas, do mais concentrado ao menos concentrado. Os poços C-, ou seja, de controle negativo, há a presença de poços sem tratamento. Os poços C+, ou seja, de controle positivo, há a presença de solução DMSO 20%. As concentrações e controles foram realizados em seis réplicas cada. Os poços em cinza estão destacados por conter somente PBS.

Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagens, considerando-se a média dos controles negativos, considerados 100% viáveis.

O parâmetro de avaliação desse teste é o estabelecimento da IC₅₀, ou seja, a concentração da substância-teste que possibilita a inibição de 50% do crescimento celular.

4.4 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E INTEGRIDADE DO DNA

A avaliação de alterações causadas nas proteínas do citoesqueleto e no DNA é fundamental para a compreensão do processo apoptótico. Dessa forma, para avaliar a ação causada pelo extrato, as células U-87 foram inicialmente plaqueadas em uma concentração de 2×10^5 células por poço em uma placa de 6 poços (*6-well Cell Culture Plate*, *Biofil®*) contendo lamínulas. Após incubação por 24h, a 37° C, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas a 1,5 mL por poço das diferentes concentrações do composto. Para o experimento foram selecionadas as concentrações de 6,25% e 3,125%. Assim, após 24h, o meio foi removido novamente e as células fixadas com 1,5 mL de solução de fixação (formaldeído 1%), por 40 minutos, além de serem permeabilizadas com

Triton X-100 em PBS, por mais 5 minutos. A última etapa foi realizada mais duas vezes, para um total de três lavagens. A partir disso, então, as células foram marcadas com 1 mL por poço da solução de marcação (0,1% Tampão Fosfato-Salino/Triton X-100 + 1:1000 faloidina + 1:2000 DAPI) e, então, levadas para refrigeração a 4° C, até o dia seguinte. Passadas as 24h, a solução de marcação foi removida e adicionada a solução de lavagem novamente em cada poço. Após um total de três lavagens, a solução foi removida e foi adicionado PBS para enxague dos poços. Por fim, as lamínulas foram preparadas em lâminas apropriadas e avaliadas por microscopia de fluorescência (HARVARD, 2020). As imagens foram tratadas através do software ImageJ.JS.

Para o controle do experimento foram utilizados 1500 uL por poço de meio completo. Todas as condições citadas foram realizadas em duplicata na placa.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

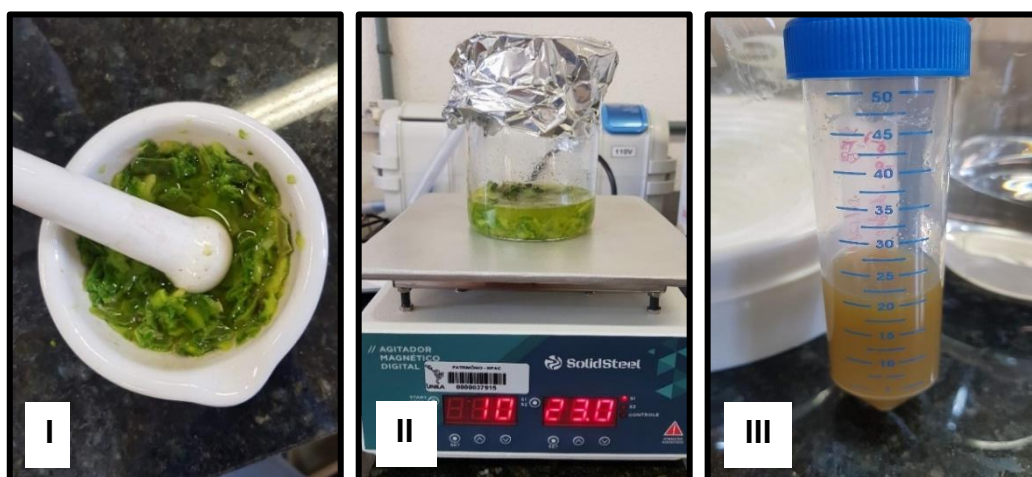
Os dados de viabilidade celular, obtidos através do ensaio do MTT, foram normalizados através de uma regressão não linear e o IC₅₀ foi determinado com o auxílio do programa *GraphPad Prism 6*.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *C. repandus*

A partir da extração hidroalcoólica de 20,4g do cladódio de *C. repandus* foram obtidos, aproximadamente, 20 mL de solução final. Nas Figura 4-I e Figura 4-II, é possível visualizar o processo de obtenção do extrato, através da maceração e mistura da solução alcoólica, respectivamente. O extrato bruto caracterizou-se como uma solução líquida, de coloração amarelo-esverdeada e elevada turbidez (Figura 4-III). A solução foi armazenada em refrigeração, a -20°C, até o momento de uso.

Figura 4. Processo de obtenção do extrato bruto de *C. repandus*.

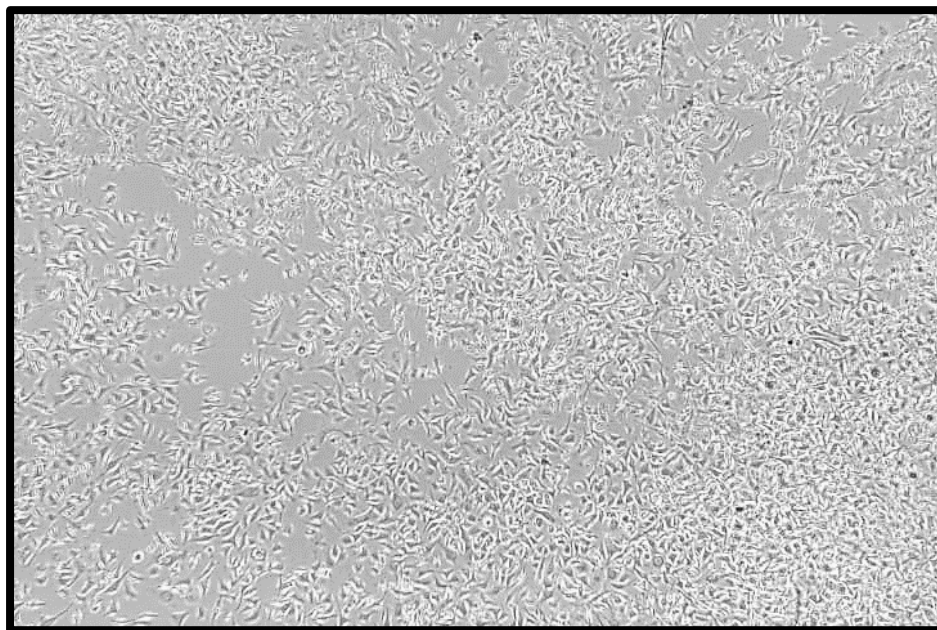


Nota: (I) Mistura do solvente com a região caulinar da planta macerada. (II) Mistura em agitador magnético. (III) Solução final.

5.2 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT

Os dados obtidos através do ensaio MTT permitiram quantificar a viabilidade celular em cada poço. A partir da análise do composto testado nas células U-87, cultivadas no experimento (Figura 5), foram obtidas as curvas de concentração-efeito com o auxílio do programa *GraphPad Prism 6*.

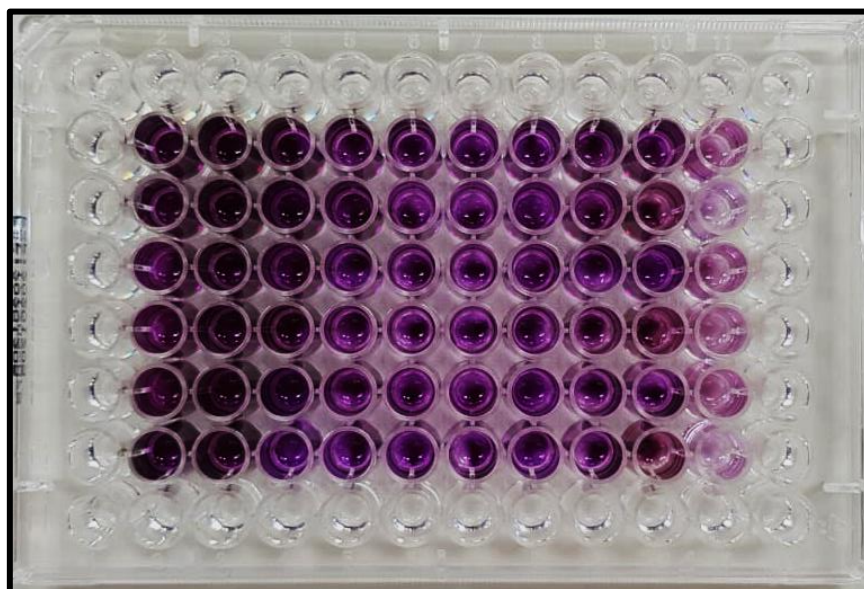
Figura 5. Morfologia das células U-87 cultivadas sob condições normais sem tratamento.



Nota: Microfotografia em microscópio invertido. Aumento de 40x (Nikon Eclipse Ti-S).
Autoria própria.

Na figura 6, é possível visualizar a placa de 96 poços após aplicação de MTT. As concentrações foram aplicadas em ordem decrescente, da maior para a menor concentração. As duas últimas colunas foram selecionadas para a aplicação dos controles negativo e positivo. Nota-se que nos poços em que se encontram as concentrações mais elevadas, há uma coloração mais intensa, enquanto que, naqueles de concentrações mais baixas, a coloração é mais sutil.

Figura 6. Placa de 96 poços após aplicação de MTT.



Nota: Placa de 96 poços em ordem decrescente de concentração, após aplicação de MTT. As duas últimas colunas em roxo (10 e 11) contém os controles negativo e positivo, respectivamente. Os demais poços sem coloração foram preenchidos apenas com PBS.

Com base nas absorbâncias obtidas, através da leitura do ensaio MTT, foi possível visualizar que a média de viabilidade celular dos grupos experimentais foi superior à média obtida no controle sem tratamento (Tabela 4). Apesar disso, nota-se que o desvio padrão obtido em todas as concentrações foi elevado, o que indica que os resultados obtidos separadamente se encontraram espalhados em um grande espectro de valores (Figura 7).

Tabela 4. Valores médios de viabilidade celular da linhagem de glioblastoma humano U-87 após exposição de diferentes concentrações do composto-teste.

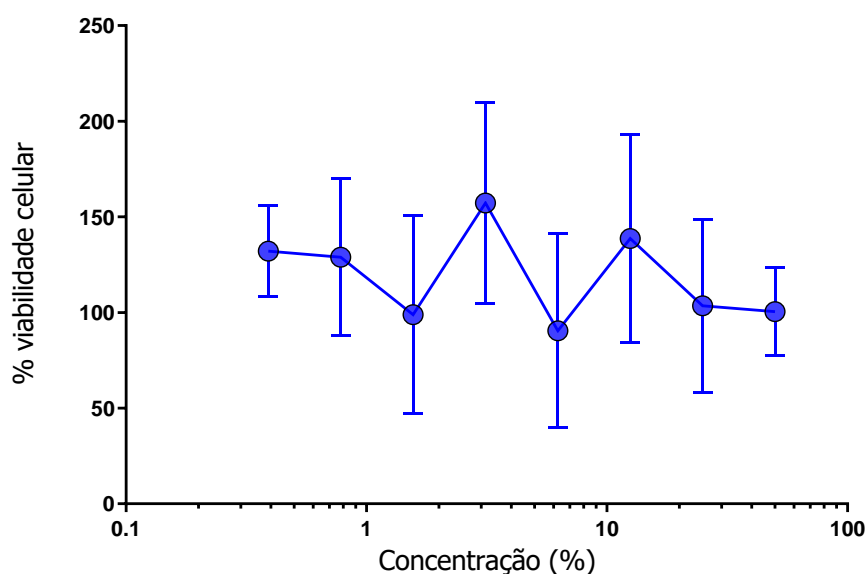
Grupos experimentais	Média	Desvio padrão
50%	126,77%	67,76%
20%	171%	123,32%
12,5%	139,83%	72,51%
6,25%	105,13%	107,46%
3,125%	130,95%	79,64%
1,57%	135,86%	71,60%

0,78%	96,66%	60,20%
0,39%	110,12%	85,12%
C- (sem tratamento)	100%	40,90%

Notas: não foi possível estabelecer um valor de IC₅₀.

A Figura 7 mostra a variação de forma mais clara, em uma relação concentração e viabilidade celular, após incubação com o extrato, durante 24 horas. Com base nos dados obtidos, este composto não apresentou diferenças significativas na redução da viabilidade celular.

Figura 7. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Cereus repandus*, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade das células U-87.



Nota: Cada ponto representa a média \pm desvio padrão dos grupos experimentais com as concentrações realizadas em sextuplicatas, utilizando-se do ensaio colorimétrico do MTT.

Por fim, sabendo-se que não houve a obtenção de uma curva relevante de viabilidade, já que o extrato apresentou uma capacidade citotóxica nula, não foi possível estabelecer um valor de IC₅₀ entre as concentrações administradas. Dessa forma, o trabalho demonstra que o extrato hidroalcoólico de *C. repandus* não é tóxico.

5.3 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E INTEGRIDADE DO DNA

Para melhor compreensão dos possíveis efeitos das diferentes

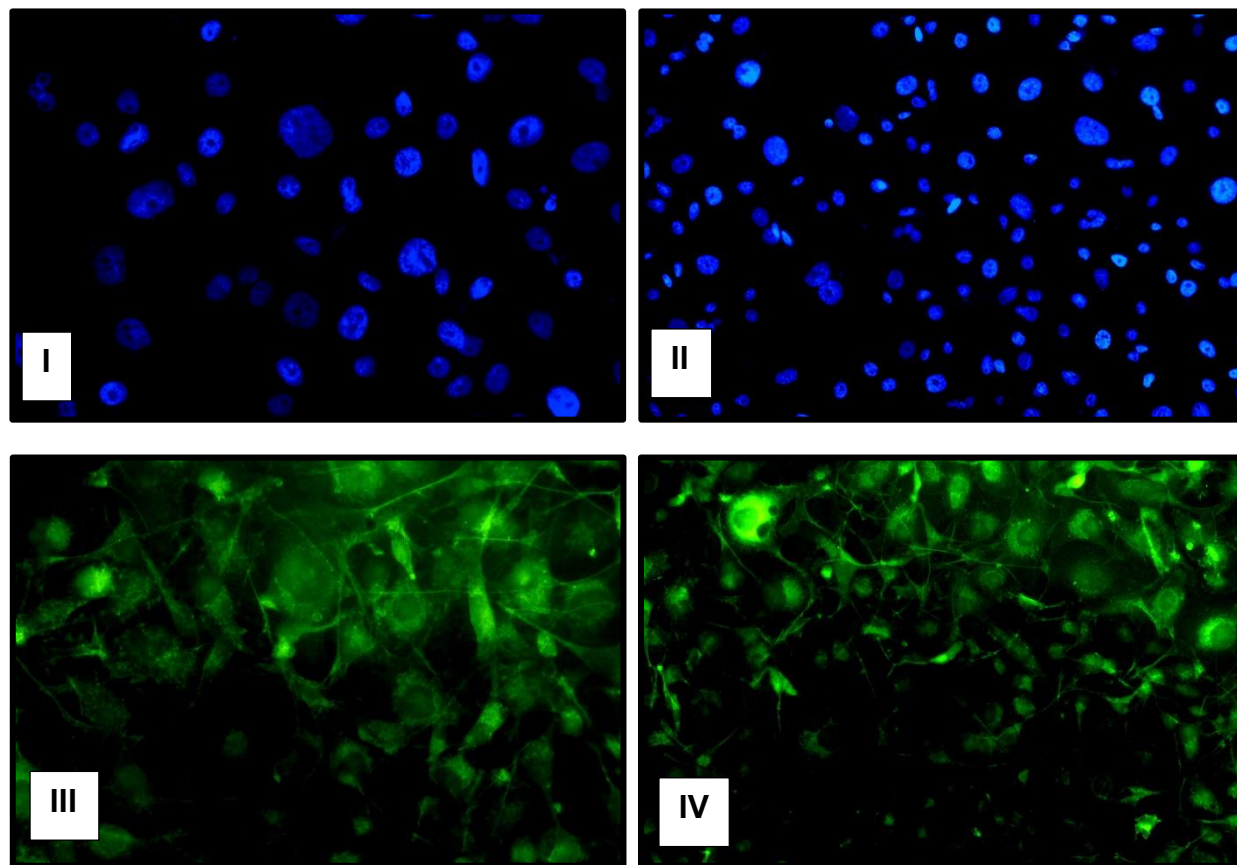
concentrações do extrato sob as células neoplásicas, foi realizado o ensaio de marcação celular, por meio da técnica de fluorescência. O ensaio permitiu a marcação das fibras de actina, pela adição de faloidina, e marcação dos núcleos, através de DAPI.

Dentre os grupos experimentais utilizados para avaliação do citoesqueleto e da integridade do DNA, foram selecionados aqueles que continham o extrato nas concentrações de 3,125% e 6,25%. Tais grupos foram analisados por apresentarem concentrações intermediárias de análise e, assim, evitar efeitos de concentrações altas ou baixas.

Considera-se o DAPI um marcador de viabilidade nuclear, já que ao se ligar a dupla fita de DNA, é possível visualizar a estrutura nuclear e estudar tamanho, morfologia e integridade nuclear. Os resultados conseguiram demonstrar que, de fato, o extrato não interferiu sobre a estrutura nuclear das células U-87, quando testado sob concentração de 3,125% (Figura 8-I; Figura 8-II). Da mesma forma, em concentração de 6,25%, não houveram alterações perceptivas sob microscopia de fluorescência (Figura 9-I; Figura 9-II). Assim, infere-se que não houveram efeitos significativos de citotoxicidade, já que não foi possível verificar danos na região nuclear, mais especificamente, no DNA das células testadas.

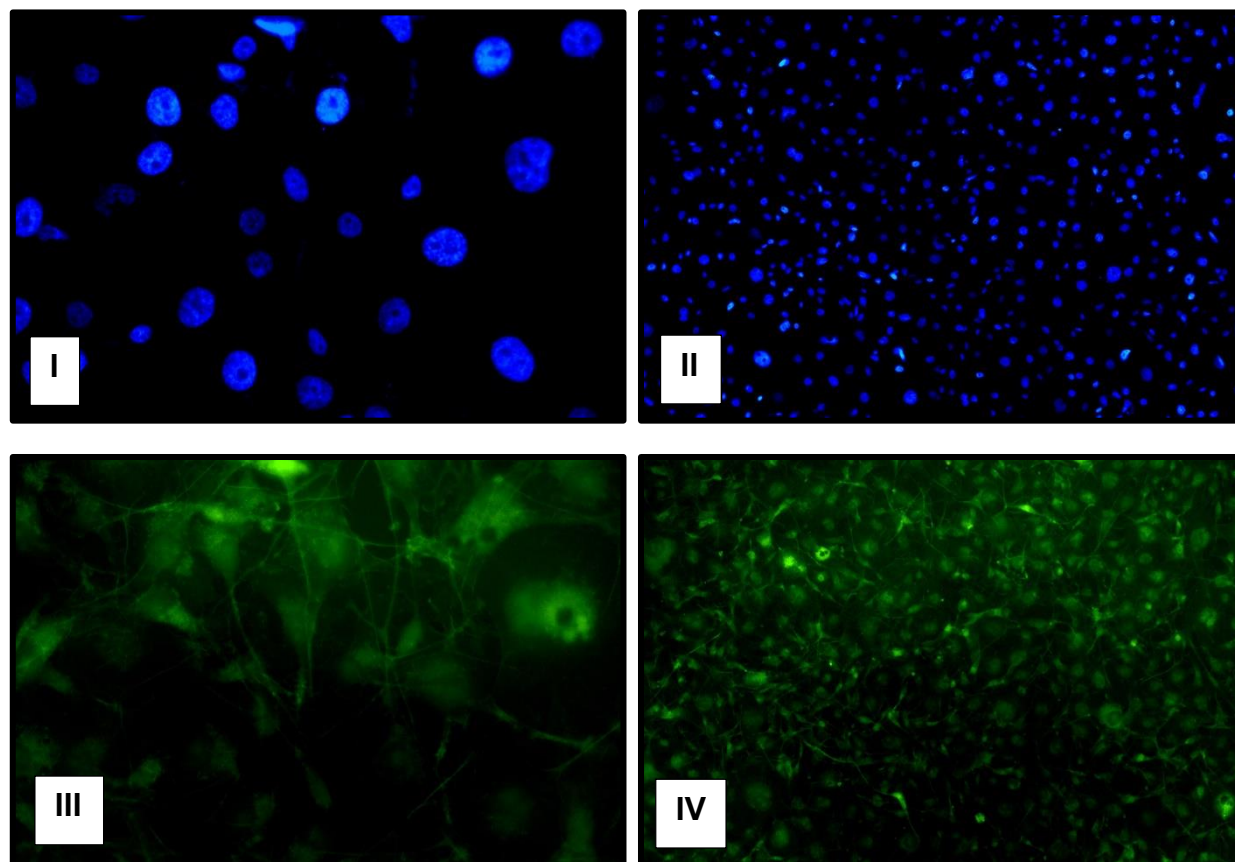
Além disso, os dois grupos experimentais, quando marcados com faloidina, também não apresentaram alterações evidentes no citoesqueleto (Figura 8-III; Figura 8-IV; Figura 9-III; Figura 9-IV;). Com isso, pode-se inferir que não houveram danos ou modificações em nível do citoesqueleto celular, nas fibras de actina.

Figura 8. Influência do extrato, na concentração de 3,125%, sobre o núcleo e citoesqueleto de células U-87, avaliada por microscopia de fluorescência.



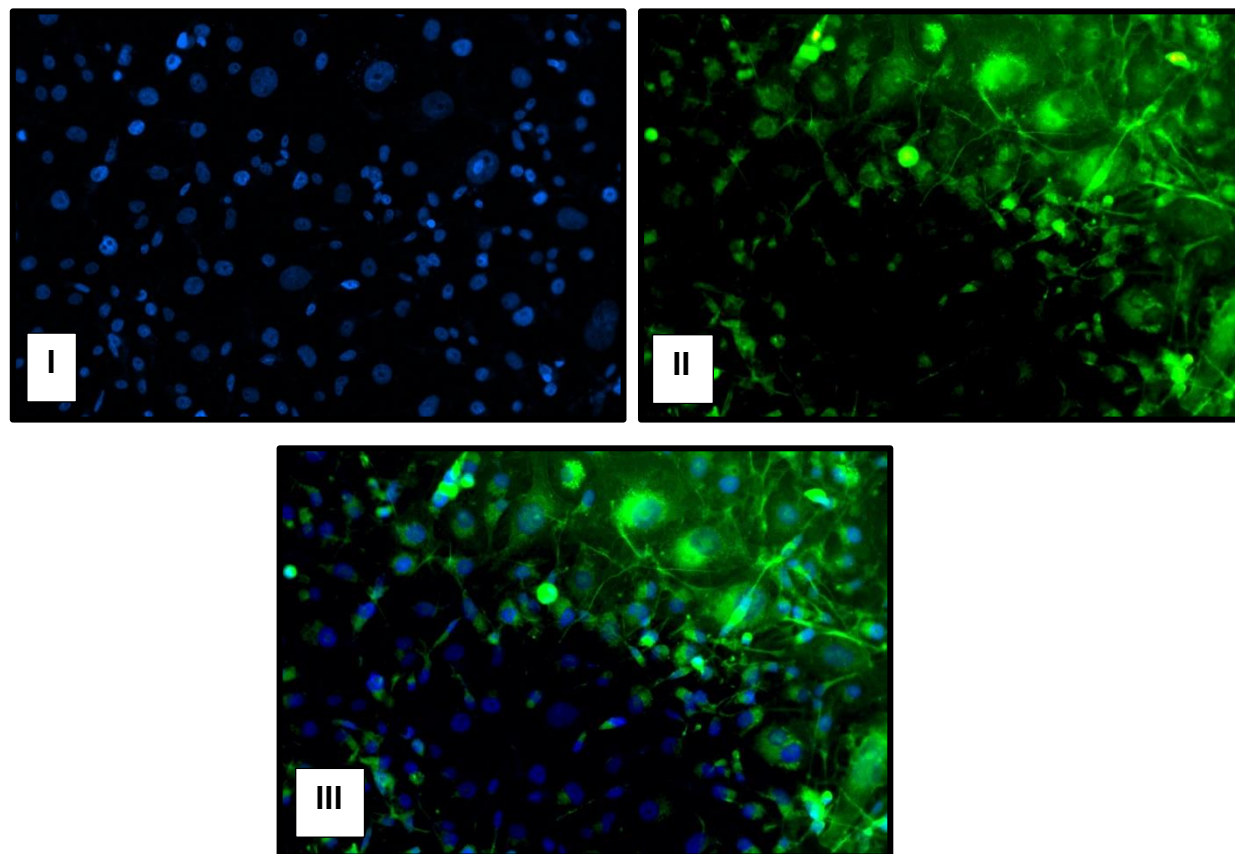
Nota: As células foram coradas com DAPI (I e II), para marcação nuclear (azul), e faloidina (III e IV), para marcação das fibras de actina (verde). Imagens capturadas com objetiva de 40x e 10x.

Figura 9. Influência do extrato, na concentração de 6,25%, sobre o núcleo e citoesqueleto de células U-87, avaliada por microscopia de fluorescência.



Nota: As células foram coradas com DAPI (I e II), para marcação nuclear (azul), e faloidina (III e IV), para marcação das fibras de actina (verde). Imagens capturadas com objetiva de 40x e 4x.

Figura 10. Morfologia do núcleo e citoesqueleto de células U-87, sem tratamento, avaliada por microscopia de fluorescência.



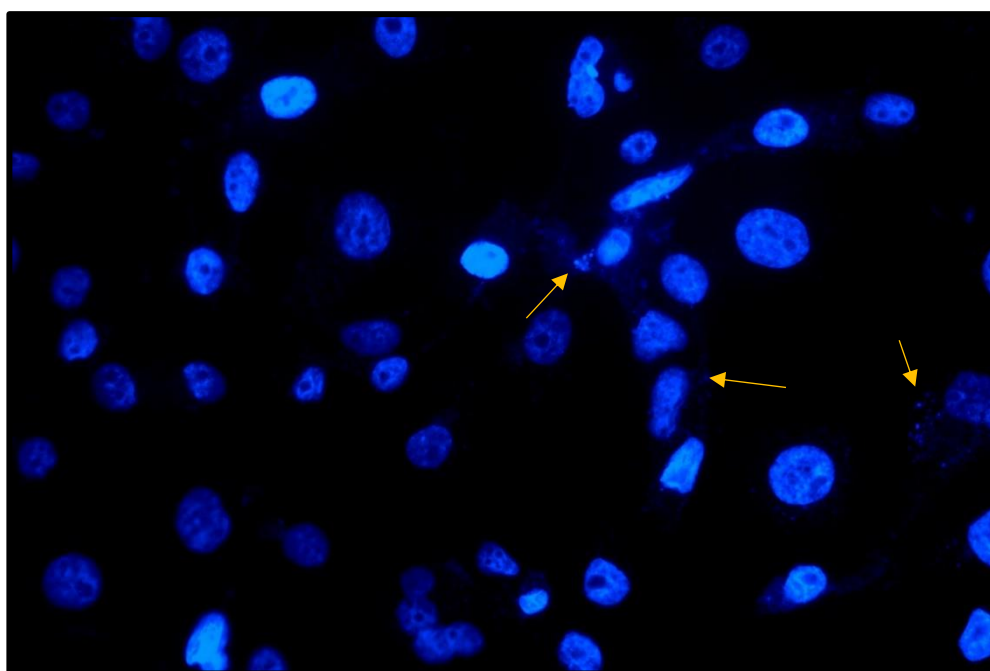
Nota: As células foram coradas com DAPI (I), para marcação nuclear (azul), e faloidina (II), para marcação das fibras de actina (verde). Imagens sobrepostas (III). Imagens capturadas com objetiva de 10x.

5.4 DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM CULTIVO CELULAR

Micoplasmas (*Mycoplasma* spp.) são microrganismos originários de bactérias gram-positivas, pertencentes a classe Mollicutes e são caracterizados por sua falta de parede celular (MACEDO, 2014). Esses organismos costumam ser indetectáveis a olho nu ou mesmo por microscopia óptica, sendo considerados os menores organismos de vida livre (0,2 a 0,8 μm), independentes de células. Além disso, frequentemente, apresentam resistência a muitos antibióticos comumente utilizados em cultivos celulares, tais como penicilina e estreptomicina (MACEDO, 2014).

Com a introdução de antibióticos, bactérias e fungos puderam ser controlados em meios de cultivo, no entanto, os micoplasmas passaram a aparecer com mais frequência nas culturas celulares (MIYAKI *et al.*, 1989). Através do ensaio de fluorescência realizado neste estudo, foi possível detectar a presença de tais organismos. Tal como mostra a figura abaixo, os micoplasmas se desenvolveram ao redor das estruturas nucleares, sendo perceptíveis através da marcação de DAPI (Figura 11).

Figura 11. Análise da presença de micoplasmas no cultivo de células U-87.



Nota: Setas em amarelo indicam a presença de micoplasmas no cultivo das células U-87. Imagem tratada para uma melhor observação dos organismos.

6 DISCUSSÃO

Os tumores cerebrais são caracterizados por sua alta morbidade e alta taxa de mortalidade. Isso se dá principalmente por sua localização e por sua rápida expansão. Os glioblastomas, mais especificamente, são considerados os mais agressivos dos gliomas já descritos, manifestando-se em pacientes de várias idades, mas, principalmente, daqueles acima de 50 anos (WELLER *et al.*, 2015).

O tratamento para os glioblastomas leva em conta a natureza quase incurável da doença (LEFRANC *et al.*, 2006). De maneira geral, pacientes acometidos com esse tipo tumoral fazem o uso de cirurgias, tratamento radiológico e quimioterápico. A intervenção quimioterápica resume-se a utilização de temozolamida, por um período de seis meses, já que dentro desse período há uma rápida progressão da doença, levando o paciente à morte (LEFRANC *et al.*, 2006).

A aplicação de quimioterapias convencionais costuma não obter êxito na recuperação de pacientes. Isso é dado devido as propriedades intrínsecas desse tumor, que tornam esse tipo celular resistente a estímulos pró-apoptóticos (LEFRANC *et al.*, 2006). Dessa forma, faz-se necessário o investimento em pesquisas de novos agentes quimioterápicos, que possam auxiliar na melhora da taxa de sobrevivência de pacientes, principalmente, com a doença em fase mais avançada.

Nesse sentido, as plantas medicinais têm sido uma alternativa comum em pesquisas de novos tratamentos anticâncer. Cerca de 50% dos fármacos utilizados para esse fim são derivados de fontes naturais (REZADOOST; KUMLEH; GHASEMPOUR, 2019), tais como a vincristina e vimblastina, derivadas do extrato metanólico de *Catharanthus roseus*, que apresentam efeitos citotóxicos contra diversos tipos de câncer (EDA *et al.*, 2002). Mais especificamente, a vimblastina apresenta a capacidade de inibir, principalmente, as fases G2/M do ciclo celular, as quais afetam diretamente a duplicação cromossômica e o processo de divisão (COMÍN-ANDUIX *et al.*, 2001). Dessa forma, esse fármaco é capaz de induzir a apoptose celular e destruir células neoplásicas.

De maneira mais específica, as plantas da família Cactaceae vêm sendo alvo de pesquisas relacionadas aos seus potenciais farmacológicos (HARLEV *et al.*, 2013). Seus frutos e cladódios apresentam, no geral, componentes importantes, que os classificam como potenciais fontes de drogas anticâncer, tais quais carotenos, betalainas, ácidos e pectinas (ZOU *et al.*, 2005). Dessa forma, foi visado neste trabalho a utilização do extrato de cladódio da cactácea *C. repandus* para verificação de citotoxicidade em células de glioblastoma humano.

Métodos de extração de maior eficiência, praticidade, otimização de tempo e custos são, geralmente, visados quando se aborda a obtenção de compostos bioativos (CUNHA, 2018). Costuma-se, então, em análises químico-farmacológicas de plantas, a preparação de extrato hidroalcoólicos (etanol/água), já que possibilita a extração de muitos compostos sem muita complexidade (FILHO; YUNES, 1998). Devido as diferentes polaridades dos solventes, é possível a extração de compostos tanto polares (aquosos), quanto apolares (etanólico). Portanto, esse tipo de extração confere algumas vantagens em seu uso (CHAICOUSKI *et al.*, 2014). Consequentemente, no presente estudo, foi utilizada a técnica citada para a obtenção do extrato.

Apesar disso, verificou-se que a utilização do extrato bruto hidroalcoólico de *C. repandus* não demonstrou efeito na viabilidade das células de glioblastoma humano, visto através do ensaio MTT, nem nas morfologias nuclear e de citoesqueleto, analisadas por técnica de fluorescência. Dessa forma, analisa-se a possível interferência de alguns fatores que levaram a esse resultado.

Primeiramente, a preparação do extrato se deu através da maceração da região caular, cladódio, da planta. Estudos comparativos mostram que boa parte dos efeitos de inviabilidade celular são realizados através da utilização de extratos obtidos de outras partes das plantas, tais como frutos, raízes e folhas. Hahm *et al.* (2010) avaliaram o potencial de citotoxicidade dos frutos da espécie, de mesma família, *Opuntia humifusa*. O estudo utilizou-se de um extrato de hexano particionado em água e indicou a diminuição da viabilidade celular conforme a concentração, através do ensaio colorimétrico MTT. Além disso, a partir da técnica de citometria de fluxo utilizada no estudo, foi possível visualizar os efeitos sobre o ciclo celular e o processo apoptótico, bem como aumento na

produção de ROS nas células U-87 (HAHM; PARK; SON, 2010).

Estudos de citotoxicidade utilizando *C. peruvianus*, sinônimo de *C. repandus*, também já foram realizados. Ao contrário do presente estudo, que se utilizou de um extrato bruto, a atividade antiproliferativa estudada por Jacomini *et al.* (2015) se baseou na utilização do extrato da cultura de tecidos da planta e na separação em lipídeos, glicolipídios e fosfolipídios, através da técnica de cromatografia em coluna. A obtenção do extrato foi realizada através de maceração e adição de solução de clorofórmio e metanol, que viria a produzir o extrato lipídico bruto. Os estudos foram feitos em células de adenocarcinoma colorretal humanas e demonstraram um IC₅₀ de 250 µg/mL (JACOMINI *et al.*, 2015). Esses dados corroboram com a ideia de que a utilização de um extrato bruto pode implicar na divergência de resultados obtidos, já que algumas substâncias ali presentes podem atuar como antagonistas e, assim, anular seus efeitos.

Também dentro da família Cactaceae, pesquisadores reportaram os efeitos do extrato de hexano e acetato de etila das folhas de *Pereskia grandifolia* em cinco tipos diferentes de carcinomas (NURESTRI; NORHANOM, 2009). Os resultados indicaram níveis satisfatórios de citotoxicidade do extrato de hexano sobre células de carcinoma epidermoide, KB, com um valor de IC₅₀ de 5 µg/mL. Além disso, a fração de acetato de etila não apenas demonstrou resultados sobre as células KB, mas também sobre células de carcinoma mamário, MCF7. O estudo ainda avaliou compostos específicos do extrato, através de separação por técnica de cromatografia de camada delgada, que indicaram atividade citotóxica em células KB, com IC₅₀ de 0,81 µg/mL (NURESTRI; NORHANOM, 2009). Isto indica que os compostos com citotoxicidade elevada podem ser encontrados facilmente no extrato orgânico.

Outros estudos também evidenciam que, dentro da família Cactaceae, podem ser achados alguns efeitos relacionados a citotoxicidade. O extrato aquoso do fruto de *Opuntia ficus-indica*, por exemplo, apresentou resultados de citotoxicidade sobre células neoplásicas. No estudo, realizado por Zou *et al.* (2005), foram testadas as concentrações de 0, 0.5, 1, 5, 10 e 25% (v/v) do extrato sobre as linhagens de carcinoma ovariano e orofaríngeo. Tanto as células-controle quanto as linhagens tumorais utilizadas sofreram inibição de

crescimento e aumento nos níveis de apoptose, analisados por citometria de fluxo. As fases do ciclo celular também foram afetadas, com o aumento da fase G1, ou seja, da síntese de proteínas e organelas, e o decaimento das fases G2 e S, com diminuição da duplicação do DNA e divisão celular.

A falta de informações sobre o conteúdo do extrato também pode ser considerada um obstáculo nos estudos realizados. Para melhor compreensão das propriedades do extrato, seria necessária a identificação das moléculas ali presentes, através de técnicas analíticas, como a cromatografia. Dessa forma, seria possível indicar a presença ou não de compostos com propriedades conhecidas em *C. repandus* para serem utilizadas em futuros estudos. Não somente isso, mas também é válida a comparação de diversos outros tipos de extrações. Como citado já em outros estudos, extrações orgânicas a base de hexano e metanol apresentaram potencial para a obtenção de compostos de interesse (HAHM; PARK; SON, 2010; JACOMINI *et al.*, 2015).

Ainda no que se refere ao extrato, é possível visualizar uma discrepância nos resultados obtidos na placa de 96 poços, após aplicação de MTT. Isso se observa, principalmente, pela coloração das três primeiras concentrações testadas, em 50%, 25% e 12,5% (Figura 6). Usualmente, o ensaio do MTT consiste na capacidade de discriminar células vivas daquelas não vivas, a partir da redução de tetrazólio em formazan, um produto de coloração azulada (CARMICHAEL *et al.*, 1987). Dessa forma, testes de fármacos em concentrações mais baixas costumam apresentar resultados em que se observam visualmente uma coloração mais forte, ou seja, uma maior formação de formazan, o que gera dados de viabilidade positiva. Já em concentrações mais altas, as quais deveriam apresentar certo nível de toxicidade, apresentam-se em uma coloração mais clara, indicando morte celular. No entanto, como visto, neste trabalho, as concentrações mais elevadas testadas acima apresentaram tal coloração mais forte, implicando em uma variável interessante a ser analisada.

É possível então verificar neste ensaio uma possível interação do extrato hidroalcoólico com o meio de cultivo utilizado. Durante a aplicação do extrato, as três primeiras concentrações analisadas, as quais foram as maiores, tiveram a capacidade de alterar a coloração do meio, que, inicialmente, apresentava-se rosa e modificou-se para uma cor amarelada, antes da aplicação do MTT. Pode-

se inferir que houve alterações na concentração de íons de hidrogênio (pH), já que o meio DMEM deve se manter estável em um pH em torno de 7,4, para o cultivo de células (FRESHNEY, 2010). Dessa forma, a reação ocasionada após aplicação do MTT, pode ser relacionada a acidificação do meio, pela adição do extrato, ou até pela interferência de outros componentes presentes nessa solução. Na leitura da absorbância (ABS) percebeu-se que o aumento da coloração não foi acompanhado de um aumento de ABS na longitude de onda específico para o MTT e, portanto, não houve superprodução de formazan. A partir dessa análise, fica clara a necessidade de compreender melhor o conteúdo do extrato, a partir de identificação de moléculas específicas ali presentes.

Outra variável importante a ser discutida foi a presença de micoplasmas no cultivo das células U-87, detectada através da técnica de fluorescência (Figura 12). De acordo com Olarerin-George & Hogenesch (2015), esses microrganismos apresentam a capacidade de competir com as células em cultivo por nutrientes, além de induzir alterações cromossômicas (OLARERIN-GEORGE; HOGENESCH, 2015). Análises de microarranjo em culturas celulares também revelaram os efeitos dessas bactérias sobre a expressão de genes, incluindo oncogenes, citocinas, proteínas de transporte e supressores tumorais (MILLER *et al.*, 2003).

Mais especificamente, as análises de microarranjo, realizadas por Miller *et al.* (2003), indicam interferência dos micoplasmas sobre o gene EGR1 de células de carcinoma. Os resultados demonstraram aumento de sua expressão, quando comparado a células saudáveis (MILLER *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2017) afirmam que esse gene pode funcionar tanto como supressor tumoral, quanto como um oncogene, variando com o tipo de neoplasia. Em células de glioblastoma, a expressão desse gene costuma ser reduzida quando comparada as células normais do cérebro. Apesar disso, sua presença está envolvida com a regulação das fases G0/G1 do ciclo celular, o que contribui com o processo de proliferação (CHEN *et al.*, 2017). A partir disso, infere-se que os micoplasmas podem ter apresentado influência nas células U-87, de forma a aumentar a expressão dos genes EGR1 e, conseqüentemente, aumentando sua capacidade de sobrevivência, mesmo naquelas sobre influência do extrato.

É interessante ainda analisar a relação desses microrganismos sobre a

expressão de genes da p53 (LOGUNOV *et al.*, 2015). Entende-se que a p53 desempenha um papel fundamental no processo oncogênico celular, mas, principalmente, das células de glioblastoma humano (OHGAKI; KLEIHUES, 2007). Logonov *et al.* (2015) sugeriram que contaminações por micoplasma em fibroblastos exercem influência sobre tais genes, os quais, consequentemente, levam a alterações de programação de morte celular, através da supressão gênica (LOGUNOV *et al.*, 2015). A supressão da p53 é um pré-requisito para a transformação oncogênica de células de mamíferos (SERRANO *et al.*, 1997). Essas observações estimulam, então, a ideia de que a presença de micoplasmas nos ensaios podem ter cooperado com os atuais resultados.

Apesar dos ensaios de fluorescência, no presente estudo, não indicarem alterações morfológicas notáveis, tanto nos núcleos, quanto nas fibras de actina, na linhagem celular U-87, mesmo com a presença desses microrganismos, deve-se tomar cuidado, pois a manifestação de micoplasmas junto as células diminuem a confiabilidade no estudo (MIYAKI *et al.*, 1989).

Esses organismos são comumente encontrados nos tecidos de origem da célula a ser cultivada, nos meios de cultura, em soros fetais, assim como, também, no aerossol que se forma após o processo de tripsinização das garrafas de cultura de células contaminadas (MIYAKI *et al.*, 1989). Com isso, a sua presença pode levar a alterações metabólicas, principalmente, aquelas relacionadas ao ácido nucleico e alterações cromossômicas (MIYAKI *et al.*, 1989). Dessa forma, a prevenção do surgimento de micoplasmas em cultivos de células animais/humanas se torna importante, no entanto, difícil por inúmeros fatores. Primeiramente, a dimensão relativamente pequena quando comparada aos outros microrganismos, permite que os micoplasmas possam atravessar membranas de filtração. Além disso, a falta de parede celular faz com que os antibióticos utilizados rotineiramente nos laboratórios sejam ineficazes a longo prazo (OLARERIN-GEORGE; HOGENESCH, 2015). De acordo com Young *et al.* (2010), esses microrganismos ainda apresentam a capacidade de atingir altas concentrações em meio de cultivo, sem a formação de turbidez, o que faz com que a detecção visual seja inviável, na maioria das vezes (YOUNG *et al.*, 2010). Para que essa problemática não se torne comum e venha a prejudicar futuros estudos, é fundamental que haja testes regulares para detecção de

micoplasmas, além da manutenção das boas práticas de laboratório.

Por último, deve-se citar os valores elevados dos desvios-padrão obtidos em todas as concentrações testadas. Isto revela que os resultados obtidos em cada réplica variam dentro de um grande espectro de valores. Dessa forma, faz-se necessário revisar o desenvolvimento da metodologia, de maneira a compreender erros analíticos que podem ter ocorrido ao longo do estudo e diminuir assim as grandes variações de resultados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Apesar do potencial citotóxico de *C. repandus* já relatado na literatura, foi visto que o seu extrato bruto hidroalcoólico não demonstrou efetividade relacionada a diminuição da viabilidade celular quando testado em células de glioblastoma humano. Alterações nucleares e de citoesqueleto também não foram perceptíveis sob microscopia de fluorescência.
- Estudos de caracterização de moléculas presentes no extrato são recomendadas, a fim de maior compreensão das propriedades bioativas do composto.
- Com o intuito de comparação, recomenda-se a utilização de outras técnicas de extração e/ou outras partes da planta e verificação de seu potencial citotóxico na linhagem celular U-87.
- Visualiza-se a necessidade de futuros estudos de quantificação e influência de micoplasmas sobre cultivos celulares, tanto da linhagem celular U-87, quanto para as demais neoplasias. A possível interferência desses microrganismos sobre a expressão de genes essenciais nas células deve ser melhor compreendida.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. **Food Chemistry**, v. 327, 2020.
- AGRA, M. D. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008.
- AGRA, M. DE F.; DE FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALENTORN, A. et al. Molecular profiling of gliomas: Potential therapeutic implications. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 15, n. 8, p. 955–962, 2015.
- BOLAÑOS-CARRILLO, M. A. et al. Effect of Sterols Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- BRAVO FILHO, E. S. et al. Levantamento etnobotânico da família Cactaceae no estado de Sergipe. **Revista Fitos**, v. 12, n. 1, p. 41–53, 2018.
- CAO, W. Growth and Metastasis of Breast Cancer Cells by Suppressing FAK signaling with. **Scientific Reports, Nature**, p. 1–11, 2015.
- CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v. 47, n. 4, p. 936–942, 1987.
- CHABNER, B. A.; JR, T. G. R. Chemotherapy and the war on cancer. v. 5, n.

January, 2005.

CHAICOUSKI, A. et al. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PRESENTES EM EXTRATOS LÍQUIDO E SECO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, p. 33–41, 2014.

CHEN, D. et al. Inhibition of EGR1 inhibits glioma proliferation by targeting CCND1 promoter. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, p. 1–12, 2017.

COMÍN-ANDUIX, B. et al. A new bis-indole, KARs, induces selective M arrest with specific spindle aberration in neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 1235–1242, 2001.

CRAGG, G. M. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

CUNHA, M. H. **Composição química e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de própolis preta**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2018.

DAVET, A. et al. Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 561–564, 2009.

DE MEDEIROS, I. U. et al. Genotoxicity and pharmacokinetic characterization of *Cereus jamacaru* ethanolic extract in rats. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–11, 2019.

DE OLIVEIRA, A. M. et al. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289–297, 2018.

EDA, J. U. et al. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. June, p. 753–760, 2002.

FARIA-TAVARES, J. S. DE et al. Genetic relationships among accessions of mandacaru (*Cereus* spp. : Cactaceae) using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 12–19, 2013.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. ESTRATEGIES FOR OBTAINING PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM MEDICINAL PLANTS. **Química Nova**, v. 21, n. Xiv, p. 99–105, 1998.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.

FONSECA, C. O.; SANTOS, T. Q.; CARVALHO, M. G. C. Efeitos do tratamento in vitro do álcool perfílico em linhagens de glioblastomas humanos. **Arq Bras Neurocir**, v. 22, p. 56–62, 2003.

FRESHNEY, R. I. Defined Media and Supplements. In: **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. Sixth Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010. v. 8p. 99–114.

GLOBOCAN. **Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

HAHM, S.; PARK, J.; SON, Y. Opuntia humifusa Partitioned Extracts Inhibit the Growth of U87MG Human Glioblastoma Cells. p. 247–252, 2010.

HARLEV, E. et al. Anticancer attributes of desert plants: A review. **Anti-Cancer Drugs**, v. 23, n. 3, p. 255–271, 2012a.

HARLEV, E. et al. Anticancer potential of aloes: Antioxidant, antiproliferative,

and immunostimulatory attributes. **Planta Medica**, v. 78, n. 9, p. 843–852, 2012b.

HARLEV, E. et al. Cancer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review. **Planta Medica**, v. 79, n. 9, p. 713–722, 2013.

HARVARD. **Cell assay, fix and stain (DAPI, Phalloidin) Protocol**. Disponível em: <<https://fgr.hms.harvard.edu/fly-cell-staining-dapi-and-phalloidin>>. Acesso em: 17 maio. 2021.

HOCHBERG, F. H.; PRUITT, A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. **Neurology** 30, n. September, 1980.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.

IARC. **Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+]**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do cânce**. 6th. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2020a.

INCA, I. N. DE C. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/2244>>. Acesso em: 30 abr. 2021b.

JACOMINI, D. et al. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 408–414, 2015.

JAFARIAN, A.; GHANNADI, A.; MOHEBI, B. Cytotoxic effects of chloroform and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta epithymum* on Hela, HT29 and MDA-MB-468 tumor cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 115–122, 2014.

- JANG, S. J.; GARDNER, J. M.; RO, J. Y. Diagnostic approach and prognostic factors of cancers. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 18, n. 2, p. 165–172, 2011.
- JAYAKUMAR, R.; KANTHIMATHI, M. S. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 956–960, 2011.
- JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: Molecular and cellular basis of their anti- cancer action and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 27, n. 3, p. 179–209, 1998.
- JOHNSTONE, R. W. et al. Apoptosis : A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. **Cell**, v. 108, p. 153–164, 2002.
- KARIMI, N. et al. Study of genotype effect, different media and time of explanting on callus induction in *Cereus peruvianus* Mill. (CACTACEAE). **Trakia Journal of Sciences**, v. 10, n. 3, p. 19–22, 2012.
- KIM, H. J. et al. Comparative Antioxidant and Antiproliferative Activities of Red and White Pitayas and Their Correlation with Flavonoid and Polyphenol Content. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 1–8, 2011.
- KOMAROVA, E. A.; GUDKOV, A. V. Suppression of p53 : a New Approach to Overcome Side Effects of Antitumor Therapy. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 1, p. 41–48, 2000.
- LEFRANC, F. et al. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 6, n. 5, p. 719–732, 2006.
- LOGUNOV, D. Y. et al. Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-KB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. **Oncogene**, v. 27, n. 33, p. 4521–4531, 2015.

- LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.
- MACEDO, M. D. DE. Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de Mycoplasma spp . em culturas celulares Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de Mycoplasma spp . em culturas celulares. 2014.
- MANN, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, 2002.
- MCLENDON, R. et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061–1068, 2008.
- MELLINGHOFF, I. K. et al. Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 19, p. 2012–2024, 2005.
- MILLER, C. J. et al. Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. **BioTechniques**, v. 35, n. 4, 2003.
- MISHRA, T. et al. Isolation, Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from Betula utilis Bark. **Plos One**, p. 1–14, 2016.
- MIYAKI, C. et al. Micoplasma como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 39–44, 1989.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

- NURESTRI, A. M.; NORHANOM, A. W. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Pereskia granifolia* Haw. (Cactaceae) Leaves. **Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 9, 2009.
- NUSSBAUM, R. L. **Thompson Thompson Genéticamédica 8 Ed.** 8th. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.
- OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 6892–6899, 2004.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445–1453, 2007.
- OLARERIN-GEORGE, A. O.; HOGENESCH, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, p. 2535–2542, 2015.
- PECORINO, L. **Molecular Biology of Cancer [Mechanisms, Targets, and Therapeutics]**. 3th. ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2012.
- PHRMA. **2020 Medicines in Development – Cancer**. Disponível em: <<https://www.phrma.org/Report/Medicines-in-Development-for-Cancer-2020-Drug-List>>.
- PIEROTTI, M. A. et al. Oncogenes. In: **Cancer Medicine**. 9th. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2017. p. 1–22.
- RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 489–501, 2003.
- REZADOOST, M.; KUMLEH, H.; GHASEMPOUR, A. Cytotoxicity and apoptosis induction in breast cancer , skin cancer and glioblastoma cells by plant extracts. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2019.

- RIBEIRO, A. F. C. **Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- SALAZAR, J. R.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichiopenin , Peniocerol , and Macdougallin Isolated from Myrtillocactus geometrizans (Mart . ex Pfeiff .) Peniocerol , and Macdougallin Isolated from Myrtillocactus. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 66, p. 24–30, 2011.
- SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N. New treatment strategies for malignant gliomas. **Future Drugs**, v. 15, n. 10, p. 694–699, 2006.
- SCHON, K. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 2, p. 417–423, 2018.
- SERRANO, M. et al. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a. **Cell Press**, v. 88, p. 593–602, 1997.
- SILVA, A. O. **Avaliação dos efeitos antitumorais agudos e crônicos em resposta ao tratamento com Temozolomida e sua combinação com Vimblastina e Mebendazole em células de glioblastoma.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- SOCIETY, A. C. **Survival Rates for Selected Adult Brain and Spinal Cord Tumors.** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>>. Acesso em: 27 mar. 2021.
- SOLOWEY, E. et al. Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 12, 2014.

SOUSA, G. A. et al. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 218, p. 100–108, 2018.

TANAKA, L. Y. A. **Caracterização química comparativa e atividades biológicas dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas e de cultura de calos de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae).** [s.l.] Universidade Estadual de Maringá, 2010.

TIEK, D. M. et al. Alterations in Cell Motility , Proliferation , and Metabolism in Novel Models of Acquired Temozolomide Resistant Glioblastoma. **Scientific Reports**, n. April, p. 1–11, 2018.

VALASTYAN, S. Tumor Metastasis : Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 2012.

VENGOJI, R. et al. Natural products: A hope for glioblastoma patients. **Oncotarget**, v. 9, n. 31, p. 22199–22224, 2018.

WANG, W. et al. Extraordinary accumulations of antioxidants in *Ammopiptanthus mongolicus* (Leguminosae) and *Tetraena mongolica* (Zygophyllaceae) distributed in extremely stressful environments. **Botanical Studies**, v. 48, n. 1, p. 55–61, 2007.

WELLER, M. et al. Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. July, 2015.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, v. 5, n. Supplement, 2014.

WU, L. C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food**

Chemistry, v. 95, n. 2, p. 319–327, 2006.

YONG, Y. Y. et al. Biofilm inhibiting activity of betacyanins from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 68–78, 2019.

YOUNG, L. et al. Detection of *Mycoplasma* in cell cultures. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 929–934, 2010.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 102–114, 2012.

ZOU, D. M. et al. Cactus pear: A natural product in cancer chemoprevention. **Nutrition Journal**, v. 4, p. 1–12, 2005.